

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07D 311/36, 311/40, C12P 17/06, A61K 31/35		A1	(11) International Publication Number: WO 98/49153
			(43) International Publication Date: 5 November 1998 (05.11.98)
(21) International Application Number: PCT/AU98/00305			(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) International Filing Date: 28 April 1998 (28.04.98)			
(30) Priority Data: PO 6448 28 April 1997 (28.04.97) AU			
(71) Applicant (for all designated States except US): NOVOGEN INC. [US/US]; c/o Corporate Agents Inc., 1013 Centre Road, Wilmington, DE 19805 (US).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): KELLY, Graham, Edmund [AU/AU]; 1,47 Coolawin Road, Northbridge, NSW 2063 (AU). HUANG, Jiu, Li [AU/AU]; 23/9 Burley Street, Lane Cove, NSW 2066 (AU). DEACON-SHAW, Mark, G. [AU/AU]; 72 Glenrock Parade, Koolewong, NSW 2256 (AU). WARING, Mark, A. [AU/AU]; 68 Elanora Road, Elanora Heights, NSW 2010 (AU).			
(74) Agents: STEARNE, Peter, Andrew et al.; Davies Collison Cave, Level 10, 10 Barrack Street, Sydney, NSW 2000 (AU).			Published <i>With international search report.</i> <i>With amended claims.</i>
(54) Title: PREPARATION OF ISOFLAVONES FROM LEGUMES			
(57) Abstract <p>Processes for the production of isoflavones are described wherein plant material from plants of the genus <i>leguminosae</i> are contacted with water, a C₁-C₁₀ organic solvent, and optionally an enzyme which cleaves isoflavone glycosides to the aglucone form, so as to form a combination, incubating the combination for a time sufficient to allow isoflavones of the aglucone form to partition into the organic solvent, and thereafter recovering isoflavones from the organic solvent.</p>			

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-500636

(P2002-500636A)

(43) 公表日 平成14年1月8日(2002.1.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 0 7 D 311/40		C 0 7 D 311/40	
A 2 3 L 1/20		A 2 3 L 1/20	D
A 6 1 K 31/353		A 6 1 K 31/353	
C 0 7 D 311/36		C 0 7 D 311/36	
C 1 2 P 17/06		C 1 2 P 17/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-546412
(86) (22) 出願日 平成10年4月28日(1998.4.28)
(85) 翻訳文提出日 平成11年10月28日(1999.10.28)
(86) 国際出願番号 P C T / A U 9 8 / 0 0 3 0 5
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 4 9 1 5 3
(87) 国際公開日 平成10年11月5日(1998.11.5)
(31) 優先権主張番号 P O 6 4 4 8
(32) 優先日 平成9年4月28日(1997.4.28)
(33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)

(71) 出願人 ノボゲン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 デラウェア州 19805,
ウィルミントン, センター ロード 1013
コーポレイト エイジェンツ インコー
ポレイテッド内
(72) 発明者 ケリー, グレアム, エドモンド
オーストラリア ニューサウスウェールズ
2063, ノースブリッジ, クーラウィン
ロード 1, 47
(74) 代理人 弁理士 藤野 清也 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マメ類からのイソフラボン類の製法

(57) 【要約】

マメ科の植物に由来する植物材料を水、C₁-C₁₀の有機溶媒、及び好ましくはイソフラボングリコシドをアグルコンを形成するように分解する酵素と接触させ、混合物を形成し、混合物をアグルコン形のイソフラボン類が有機溶媒中に分配するのに十分な時間放置し、その後有機溶媒からイソフラボン類を回収することよりなるイソフラボン類の製造方法が記載されている。

【特許請求の範囲】

1. マメ科(genus Leguminosae)の植物材料を、水、 C_1 - C_{10} の有機溶媒、及びイソフラボングリコシドをアグルコン(aglucone)の形に分解する酵素と接触させて混合物を形成し、この混合物を、アグルコンの形のイソフラボンを有機溶媒中に分配するのに十分な時間インキュベートし、そしてこの有機溶媒からイソフラボン類を回収することよりなるマメ科植物からイソフラボン類を製造する方法。
2. 有機溶媒が回収され、有機溶媒がイソフラボン残滓を得るために除去され、そして、この残滓がその中でイソフラボン類がイソフラボン類沈殿物のような実質的に不溶性であり、そして続いて回収される有機溶媒と混合される、請求の範囲1による方法。
3. そのなかに溶解されているイソフラボン類を含む混合物中で有機溶媒が水と混和することができ、残滓と水とを含むイソフラボン類を得るために除去され、そして、その後水と混和しない C_1 - C_{10} のイソフラボン可溶化有機溶媒と混和し、有機相と水性相とを生じさせ、イソフラボン類を溶解して含んでいるこの有機溶媒相を集め、それからイソフラボン類を回収する請求の範囲1による方法。
4. 有機溶媒相を水を添加して蒸発させ、その後イソフラボン類を水可溶性綿状固まりを形成させる請求の範囲3による方法。
5. 混合物か、酵素及び植物材料を含有する水性相、及びイソフラボン分配物を含む有機相よりなる請求の範囲1による方法。
6. 混合物が、有機溶媒と水との激しい混合によって形成されたエマルジョンよりなるものである請求の範囲1による方法。
7. 酵素が β -グルカナーゼと β -キシラナーゼの混和物である請求の範囲5による方法。
8. 植物材料が水及び酵素と混合され、その後有機相と水性相とを、あるいは有機溶媒と水の激しい混合によって形成されるエマルジョンを形成するように有機溶媒が加えられる請求の範囲1による方法。
9. 植物材料が水と混合され、その後酵素が有機溶媒とともに加えられる請求の範囲1による方法。

10. 植物材料が大豆またはクローバーに由来する請求の範囲 1 による方法。
11. 温度10℃～30℃で実施される請求の範囲 1 による方法。
12. 植物材料が粒子の形態である請求の範囲 1 による方法。
13. 植物材料が大豆粉である請求の範囲12による方法。
14. 植物材料が大豆胚軸(soy hypocotyls)と大豆子葉(soy cotyledons)の量を変えることのできる混合物である請求の範囲12による方法。
15. 植物材料がクローバーである請求の範囲 1 による方法。
16. 好ましくは医薬的に許容される担体及び／又は賦形剤と組み合わせた、請求の範囲 1 によって得られるイソフラボン類よりなる組成物。
17. 食品成分と組み合わせた、請求の範囲 1 によって得られるイソフラボン類よりなる食品組成物。
18. 回収されたイソフラボン類からダイゼインが精製される請求の範囲 1 による方法。
19. 請求の範囲 1 の方法によって得られるイソフラボン類。
20. 回収されたイソフラボン類からゲニステインが精製される請求の範囲 1 による方法。
21. 請求の範囲18の方法によって得られるたダイゼイン。
22. 請求の範囲20の方法によって得られたゲニステイン。

【発明の詳細な説明】

マメ類からのイソフラボン類の製法

イソフラボン類は植物性の化学物質で、マメ科に属する植物に広く存在する。それらは、Carlsonら(1980) *Journal of Chromatography* 198巻193-19ページ（参照することにより本明細書に援用する）による例に記載されているように単純なジフェノール環構造をしている。

700を超える種類のイソフラボン類が報告されており、これらは植物やイソフラボンを含んだ植物を食べるヒトも含めた動物で幅広い生物学的作用を果たしている。

イソフラボン類には小さなサブグループがあり（ダイゼイン、ゲニステイン、ビオカニン、ホルモノネチンおよびグリシテイン）、これらは動物（ヒトを含む）細胞上のエストロゲン受容体への結合能で区別されている。このことは、イソフラボン類のジフェニール環の立体構造がエストラジオール、エストロンおよびエステリオールなどのエストロゲンのステロイド環構造に似ていることに起因している。ステロイドエストロゲンに比べて受容体への結合親和性はかなり低い、エストロゲンイソフラボン類は弱いエストロゲン作用を持つ。このグループはまた動物細胞で、エストロゲン受容体とは別に見えるような多様な生物作用を示す。これには抗酸化作用、利尿作用、抗鎮痙作用および抗癌作用が含まれる。最近になって治療効果の可能性を持つこのような興味深い作用のためにイソフラボン類のこのグループは医学研究者の目を引くようになった。

植物の中ではイソフラボン類は様々な型で存在する。－(i)基本的なアグルコン型、(ii) β -グリコシド結合を介してグルコースなどのような糖と結合しているグルコンとして（グリコシド型）(iii)グルコン型+マロニル部分、および上述の(iv)Carlsonら (19

80) による例で示されたグルコン型+アセチル成分である。

グリコシド型（単独であれ、マロニル型あるいはアセチル型であれ）は水溶性で、多くのマメ類のイソフラボン類では優勢型であり、輸送や保管に役だっている。グリコシド型は熱や酸化あるいは紫外線照射といった分解要因に対しての安

定性を高める作用がある。イソフラボンが生物学的に作用する細胞内の部位では、細胞内 β -グリコシダーゼという酵素が糖部分を切り離し、生物学的にはさらに活性の高い、しかし水には溶けにくいアグルコン型になっている。

イソフラボン類はマメ科植物で優勢に見られるが、植物界ではかなり広く分布している。エストロゲン様イソフラボン類（ゲニステイン、ビオカニン、ホルモノネチン、ダイゼイン、グリシテイン）はこの一般則に従い、マメ科属に大きく限定されている。調べられたほとんどのマメ類ではこのような5つのエストロゲン様イソフラボン類の少なくとも一つ以上が検出範囲内で含まれていることが判っているが、豊富に含んでいるマメ類は、大豆、ヒラマメ、ヒヨコマメ、コロハ、クローバー、アルファルファおよび種々の豆である。これらの化合物をもっとも豊富に含んでいるのは、クローバー（アカツメクサ、地下クローバーを含む）および大豆（大豆全体あるいは脱脂大豆あるいは大豆粉、大豆胚軸および大豆糖液を含む大豆を加工するための材料）である。クローバーや大豆におけるこれらの化合物の量は、品種、季節、環境および植物の加齢要素によって変化する。クローバーでのレベルは約0.5から3.5%の間（乾燥重量を基準にして）であり、大豆では0.05から0.3%（乾燥重量）である。

イソフラボンは月経前症候群および更年期障害（米国特許第5569459号、第5516528号、第5498631号）および骨粗鬆症（米国特許第5424331号）の治療薬として、および食品添加物（米国特許第4366082号、第4390599号）として用いられる可能性がある。このように重要な用途を考えると、植物からイソフラボン類を単離し、濃縮することは利点となることである。

イソフラボン類の単離については様々な技術が提案されているが、本質的には2つの方法がある。最初の方法は水溶性のグルコン型を不溶性のアグルコン型に変換し、そのあとアルコールのような適当な有機溶媒でアグルコンを抽出しようとするものである。この変換ステップは2つの方法のうちの1つで行うとして記載されている；

(a)低いpHで高熱（通常は80～100℃）にさらして加水分解を起こさせることによ

る (Wang K, Kuan SS, Francis OJ, Ware KM, Carman As, “大豆とその加工品における植物性エストロゲンの測定に関する簡便なHPLC法” J. Agric. Food Che., 38巻185-190ページ、1990年) ;あるいは(b)糖部分の β グリコシド結合を特異的にはずす酵素 (グルコース加水分解酵素、 β グリコシダーゼ、あるいは β グルクロニダーゼ) にさらすことによる。酵素は反応に加えるか、または植物の中に天然にある β グリコシダーゼを利用することもできる。後者に関しては、方法が記載されているが (日本特許89-345164/47) それによれば、大豆中の天然の酵素活性は大豆粉末を45～55℃に数時間加熱することによって利用できる。しかし市販の大豆粉末における天然の酵素活性は変動が大きく、最大であっても存在するグルコンの50～60%を越える量を加水分解するには不十分である。

様々な加水分解反応の方法が (酵素的あるいは加熱/低pH) 地上植物への水に入れる添加剤として記載されている。加水分解過程の終わりに、不溶性の植物材料を水相から分離して次のステップを促進する。いったんグルコンからアグルコンに変換し、水溶液を有機溶媒 (水と混合できない) と接触させる。アグルコンは水に不溶なために有機溶媒相に抽出され、回収されることになる。

以前提案した方法は、グリコシド型のイソフラボン類を最初に水で抽出し、そのままの型を保つか、あるいは続いてアグルコンに変換できるというものである。この方法に記載された技術は、地上植物の材料を水に入れ、長い時間をかけて (数時間から数日) イソフ

ラボンのグリコシド型が自然に水に溶けるようにするというものである。溶けなかった植物材料を水から分離したのち、水相のイソフラボン類を上述のどれかの方法でアグルコンに変換し、続いて回収する。この方法の変形としては適当なイオン交換樹脂での吸収によって水性混合物から選択的にアグルコン型を除くというものがある。続いて水と有機溶媒の混合物でイソフラボン類を溶出し、回転式蒸発で濃縮し、酵素消化あるいは加熱/酸処理によってアグルコンに加水分解する (日本特許95-272884/36)。

上述の技術の不利な点は、(a)ステップの煩雑さ、(b)加熱、および/あるいは強酸および/あるいは強アルカリなどのような過激な処理、(c)イソフラボン類の

収量が相対的に低い、(d)加水分解酵素の費用が極めて高い、および(e)大規模に多くのステップを踏んでイソフラボン類を商業的な質で抽出することに関連した資本コストや稼動コストが高いことである。イソフラボンの抽出については現在知られている方法はすべて、これらの不利な点の1つ以上の影響を受けていて、商業的に成り立つことを大きく妨げている。エストロゲン様イソフラボン類は地域医療に貢献するというような主旨が実感されるようになれば、一般社会にとってイソフラボン類は経済的に利用し易いものになるにちがいない。このようなことのために抽出方法を改良し、費用効率の良いものにしなければならない。

発明の概要

本発明の最もブロードな局面は、植物材料を、混合物を形成するため、水、 $C_1 - C_{10}$ 有機溶媒、及び所望によりイソフラボン・グリコシドをアグルコン型に切断する酵素と、接触すること、及び有機溶媒にアグルコン型のイソフラボン類を有機溶媒中に区画するために、前記混合物を十分な時間インキュベートすること、及びその後、有機溶媒からイソフラボンを受け取ることよりなるマメ科属の植物からイソフラボン類を生産するプロセスを提供することである。

前述の成分の組み合わせは、酵素及び植物材料を含有する水相及びその中にイソフラボン類が分配された有機相を含むことができる。その組み合わせ物は、代替的に、有機溶媒と水の激しい混合によって形成されたエマルジョンを含むこともできる。あるいは、水溶性の有機溶媒が用いられる場合、その組み合わせ物は、水と有機溶媒の組み合わせである。

有機溶媒が水不溶性の場合、溶解したイソフラボン類を含有する当該有機溶媒は、残留物を含有するイソフラボンを得るため、例えば蒸発することによって除去される。その後、その残留物はイソフラボンが実質的に不溶性である $C_1 - C_{10}$ 有機溶媒と混合され、イソフラボン類は沈殿し、続いて回収される。

有機溶媒が水溶性の場合、この組み合わせにおいて有機溶媒は、残留物と水を含有するイソフラボンを得るため、例えば蒸発によって除去される。有機相及び水相を得るため、イソフラボンを溶解している水不溶性の $C_1 - C_{10}$ 有機溶媒と混合することができる。溶解したイソフラボンを含有するその有機溶媒相は、集

められ、イソフラボン類はそこから回収される。有機溶媒は水を追加して蒸発され、その後、イソフラボン類は水に不溶な凝集物質を形成し、続いて回収される。

酵素がイソフラボン・グリコシドをアグルコン型に切断するために用いられる場合、好ましくは β -グルカナーゼを含有する。より好ましくは、その酵素は、 β -グルカナーゼと β -ザイラナーゼの混合（又は、組み合わせ）である。

別の局面は、本発明のプロセスに従って生産されたイソフラボン類よりなる組成物を提供することである。

発明の詳細な説明

本発明は、その最もブロードな局面において、マメ科属の植物からイソフラボン類を生産するプロセスを提供することであり、それ

は植物材料を、水、 $C_1 - C_{10}$ 有機溶媒、及び所望によりイソフラボン・グリコシドをアグルコン型に切断する酵素と接触させ、組み合わせ物を形成させて、及び有機溶媒にアグルコン型のイソフラボンを有機溶媒中に分配するために、前記組み合わせ物を十分な時間インキュベートしてその後、有機溶媒からイソフラボンを回収することよりなる。

植物材料、水、 $C_1 - C_{10}$ 有機溶媒、及び所望によりイソフラボン・グリコシドをアグルコン型に切断する酵素と一緒に結合することからもたらされた組み合わせ物は、酵素及び植物材料を含む水相及び酵素による切断を伴うイソフラボン類を分配する有機相からなる相分離した混合物の形であってもよい。この組み合わせ物は、有機溶媒と水の激しい混合によって形成されたエマルジョンを含むこともできる。あるいは、有機溶媒が水溶性である場合、その組み合わせ物は、水と有機溶媒の混合物であってもよい。その混合物がエマルジョンからなる場合、イソフラボンのアグルコン型が有機溶媒中に分配されるに十分な時間の後に、エマルジョンから粒状物質を濾過又は遠心などの標準的な分離プロセスを用いて除去することが好ましい。その後、相分離が起こり、続いて有機溶媒成分からイソフラボン類を回収することができる。

有機溶媒が水不溶性の場合、溶解したイソフラボン類を含有する該有機溶媒成

分を例えば蒸発によって除去してイソフラボン含有残留物を得る。その後、その残留物はイソフラボンは実質的に不溶性である $C_1 - C_{10}$ 有機溶媒と混合され、イソフラボンは沈降し、続いて回収される。

有機溶媒が水溶性の場合、この組み合わせ中の有機溶媒は、残留物と水を含むイソフラボンを得るため、例えば蒸発によって除去される。その後、有機相及び水相を得るため、イソフラボンが溶解している水不溶性の $C_1 - C_{10}$ 有機溶媒をと混合することができる。溶解したイソフラボンを含むその有機溶媒相は集められ、

イソフラボン類はそこから回収される。有機溶媒を水を追加して蒸発し、その後、イソフラボン類は水に不溶な凝集物質を形成し、続いて回収される。

イソフラボン・グリコシドをアグルコン型（以後、イソフラボンという）に切断するために、所望により使用される酵素は、イソフラボンとその炭水化物（通常、グルコース）部分の間の支配的な結合といわれている β -グリコシド結合を切断するために特に必要である。炭水化物化学の当業者は、これを達成するに最も適正な酵素は β -グルコシダーゼ及び多分 β -グルカナーゼである、と推定している。表1に示すように、大豆イソフラボン類のグリコシド結合を切断する能力における、異なる炭水化物酵素の相対効能を比較する実験において、 β -グルコシダーゼが非常に効果的であることが見出された。 β -グルクロニダーゼもまた予想に反し非常に効果的であることが見出された。 β -グルカナーゼは予想に反し比較的低い効能を有することが見出され、相当長い反応時間が要求される。クローバーなどの植物のある種のイソフラボンについて、内因性 β -グルコシダーゼ酵素活性は、一般的に、追加の切断酵素を必要とせずに、グルコン型の効果的な切断に十分である。それゆえ、酵素の追加は、本発明のプロセスにおいて、任意としてみなされる。

表1

グリコシド型の大豆イソフラボン類 (daidzin、genistin) のアグルコン型 (daidzein、genistein) への変換における炭水化物に作用する種々の酵素の作用比較

酵素のタイプ (注相対活性 (変換%))

β -グルコシダーゼ	90
β -グルクロニダーゼ	98
β -グルカナーゼ	40
1,4-bD-グルカン-ヒドロラーゼ	0
1,4-a-D-グルカン-ヒドロラーゼ	0
β -ザイラナーゼ ; b-グルカナーゼ (10 : 1)	85
β -ザイラナーゼ ; b-グルカナーゼ (1 : 1)	87

(注) 全ての酵素は、イソフラボンの標準量に同一濃度で加えた。

β -グルカナーゼ/ β -ザイラナーゼ酵素混合物はイソフラボングリコシドをアグルコン型への切断において比較的効果的であることが、本発明者らによって見出された。全く予想外なことに、これは、 β -キシラナーゼはイソフラボンのグルコン型におけるグリコシド結合の上記形に対してなんらかの効果を有することを予測する理由は全然ないことを示している。有利なことに、この菌由来酵素混合物は、有利な価格で商業的な大きな量で入手することができる。より特殊な β -グルコシダーゼ及び β -グルクロニダーゼ酵素よりも若干劣る唯一の効果ではあるが、後者の酵素はバルクな商業規模の量で、又はコスト効果的な価格で入手することができない。さらに、商業的な β -グルカナーゼ/ β -ザイラナーゼ酵素混合物の低価格はイソフラボンの単位当たりの投与量を、若干低い効率を補うより多くする。酵素を含む本プロセスの一実施態様において、有機溶媒は用いた酵素の顕著な不活性化を引き起こさない。

植物材料は、マメ科属の植物から誘導され、大豆、クローバー (つめくさ、レッドクローバー、及びその他のイソフラボンを含有するクローバーを含む)、エジプト豆、レンズ豆、豆類 (そら豆、あおいまめ、いんげん豆 (haricot, kidney, navy) 等) などの植物から得られる。これらは、一般的にその他のマメ科の植物より高いレベルでイソフラボンを含有している。マメ科の他のイソフラボン含有植物を本発明のプロセスに用いられないことはないけれども、大豆又はクローバーから誘導される植物材料を用いることが好まし

い。イソフラボン類をクローバーから抽出する場合、イソフラボングリコシドを切断する酵素の使用は不必要である。

植物材料は、好ましくは、クローバー、大豆、その他の豆類、エジプト豆及びレンズ豆などの植物材料をすりつぶして、あるいはその他の処理を行って生成された粉などの微粒子の形である。好ましい植物材料は大豆 (*Glycine max*) 又はレッドクローバーなどのクローバーである。本発明を制限することなく、抽出プロセスに曝すべき大量の材料を製造するために大部分のイソフラボン類を含有しない植物の部分可能な限り除去することが好ましい。例えば、収穫したクローバーに含まれるイソフラボン類の約90%は葉にあり、約10%が茎及び葉柄にある。したがって、茎から葉を分離することは有益であり、まず乾燥した植物を脱穀し、次いで大きな茎から小さな葉を分離するために種々のふるいで分けることによって達成される。もう1つの例として、大豆は殻を取る及び／又は脂肪をとり、殻を取ることができる。脂肪をとった大豆粉は商業的な量で容易に入手できる。別の例では、通常の殻取り処理中に大豆の子葉から頻繁に取り去られ、ふるい分けなどの標準的な方法で容易に収集される大豆の胚軸は、全体の大豆(約0.05~0.3%)に比較して極めて高いレベル(約0.5~1.5%)でイソフラボン類を含有している。

本発明の種々の実施態様で用いる有機溶媒は、1~10個の炭素($C_1 - C_{10}$)からなり、水に親和性のない有機溶媒及び／又は水に親和性の有機溶媒を含む。水親和性有機溶媒は、メタノール、エタノール、プロパノール及びイソプロパノール、酢酸、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、*n*-プロパノール、テトラヒドロフラン及びいずれかのこれらの溶媒の混合物などの $C_1 - C_{10}$ アルコールを含む。イソフラボン溶解性である水に親和性のない有機溶媒は、 $C_4 - C_{10}$ アルコール(ブタノール、ヘキサノール及びペンタノールなど)、 $C_1 - C_{10}$ アルコキシ溶媒(エチルメチルケトン、メチルフェニルケトン、ヘキサノール-2, 4-ジオンなど)、 $C_2 - C_{10}$ のエステル(酢酸エチル、エチルメチルマロネート、ジメチルホスホネートなど)、 $C_1 - C_8$ アルデヒド(ブタノン、ペンタノン、ヘ

キサネディアル、シクロヘキサンカルボアルデヒド及びブタン-1, 2, 4-トリカルボアルデヒドなど)、 C_2-C_{10} エーテル、 C_2-C_3 アルケン、 C_2-C_4 アルカン又はフェノール及びその誘導体（ベンゼン1, 2, 4-チオールなど）及びいずれかのこれらの溶媒の混合物を含む。

イソフラボン類が実質的に不溶解性である有機溶媒は、 C_5-C_{10} アルカン（ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン及びオクタンなど）及び C_4-C_{10} アルケン及びいずれかのこれらの溶媒の混合物を含む。使用する有機溶媒は、好ましくは、蒸発によって有機溶媒を除去できる揮発性を有するよう選択され（例えば、蒸留、ロータリー蒸留など）、有機溶媒に溶解したイソフラボン化合物を回収することができる。

この方法で使用する水は市水からの蒸留水、脱イオン蒸留水などである。水にはこの分野で良く知られている微生物の生育を遅延させる保存剤、その他の添加物を含む。水及び有機溶媒のそれぞれの割合は本発明においては制限するものではない。一般的に、有機溶媒に対する水の割合は、例えば1:10から10:1に変化させることができるが、等量の割合で水及び有機溶媒を使用する。

水と有機溶媒の混合物の組み合わせは有機相と水相を含み、各相をゆるやかに混合し、攪拌する。これは、そのような相を混合することなくそれぞれ相を攪拌できる垂直的に配置された攪拌機によって容易に行うことができる。

本発明の方法では、温度を上げる必要がなく、また環境温度条件、例えば5℃～35℃で行うことができる。従って、環境条件は、抽出に高温を必要とする従来技術に求められる複雑な温度制御をせずとも充分である。

一つの態様において、本発明の抽出プロセスは、ワンポット、1段階の反応であり、主設備費用及び時間のコストの節約のような実質的に利益がある。本発明の一態様に従って、1ステップで酵素消化及び溶媒抽出の有効性は、一般的な従来技術に比べて、イソフラボン産物を非常に効率よく、かつ高収率で得ることができる。

イソフラボン化合物は有機溶媒成分から、有機相の気化（蒸発）、例えば、回転式蒸発、蒸留などによって回収される。アグルコンイソフラボンを含有する少

量の油分が引き続く有機相の除去でも残ることか見だされる。このイソフラボンに富んだ油は、イソフラボン類を濃縮するためにさらに抽出を続けることが好ましいが、所望の最終生成物と見做すことができ、使用することができる。イソフラボン類を含有する油は、油に対し良く溶けるが、イソフラボン類に対する溶解性が非常に低いヘキサン、ヘプタン及びオクタンのような適当な有機溶剤を添加することにより除去することができる。ヘキサンが比較的成本が易く好ましく使用される。溶媒（例えばヘキサン）は油に対する比率を約1 : 1と50 : 1の間、好ましくは10 : 1で加える。油は直ちに有機溶媒相に分配され、イソフラボンと会合して溶液から除かれて容器の底に沈殿する。ヘキサン：油相、イオフラボンを含む残渣を残して除かれる。これを回収し例えばオーブンで50℃～120℃の温度で乾燥して、微粉末とし、続いて、後記するように治療用途に製剤化する。しかし、好ましくはヘキサン抽出工程を1～3回繰り返して油を完全に除去する。また、油を含むイソフラボンを、HPLCフラクショネーション、イオン交換、クロマトグラフィまたはイソフラボンの豊富化／精製の分野で良く知られたその他の技法に供する。

植物材料の抽出に用いる $C_1 \sim C_{10}$ の有機溶媒は水と混じり（例えばエタノールのようなアルコール）、有機溶媒は蒸発（回転式蒸発、蒸留など）によって除かれ、水中に油を含むイソフラボンを含有する濃縮物が得られる。この濃縮物をイソフラボン溶解する C

$_1 \sim C_{10}$ の有機溶媒、例えば酢酸エチルと混合して、イソフラボン含有有機相と水相とにする。有機相を集めて、そこからイソフラボン類を回収する。例えば、有機溶媒は水を添加して、例えば蒸留機を用いて蒸留し、その後イソフラボン類を水不溶性の凝集物とし、凝集物を回収し、薬学的／健康組成物に製剤化する。

この段階で抽出物はイソフラボン含有量が36～70%と高く、一般的に出発材料のイソフラボン類の比率と比較される。この材料はその状態で、例えば乾燥し、製剤化して治療目的に使用される、または更にこの分野でよく知られている処理に供してイソフラボンを精製する。さらに、精製は、HPLCフラクショネーション、イオン交換クロマトグラフィまたはこの分野で良く知られたその他の

技法に供する。例えばP L Cフラクショネーションによってダイゼインまたはゲニステインを除くことができる。

大豆が出発材料である場合、抽出されたイソフラボン類は、ダイゼイン、ゲニステインおよびグリシテインである。残りの材料はフィトステロールと他の水不溶性化合物であるクローバが出発材料である場合、抽出されたイソフラボン類は、ダイゼイン、ゲニステイン、ホルモノネチン及びビオカニンである。フィトステロールとクロロフィルを含む種々のフラボン類を残りの分離物のバルクとする。

本発明の方法で製造したイソフラボン類は個々に精製する。例えば、ダイゼインとゲニステインH P L C、または他のクロマトグラフ技法またはこの分野で知られたこれら化合物精製の標準的な方法で精製することができる。

このイソフラボン類は薬学組成物、健康組成物、飲料、食品等に、この分野で知られている適当な賦形剤、担体など、例えば薬学的添加剤ハンドブック第2版、アメリカ薬学会〔Handbook of Pharmaceutical Excipients, Second Edition, America Pharmaceutical Association)1994年（参照することにより本明細書に援用する）。薬学組成物または健康組成物は錠剤、カプセル、溶解粉末、シロップ

などを含む。このような製剤に用いる標準的な担体／賦形剤には微結晶セルロース、リン酸水素カルシウム、ステアリンiiiマグネシウムおよびコロイド珪酸が含まれる。イソフラボン類を含有する食品には、棒状食品、ビスケット、スナック食品、この分野でよく知られているその他の標準的な形態を含む。飲料品には芳香剤、バツハーなどを入れることができる。

他の視点では、本発明方法により製造するときは、イソフラボン類を、任意に薬学的に許容される担体及び／または賦形剤とともに含む組成物を提供する。この組成物、食品組成物、例えば食品またはミューズリーバー類、ビスケット類、飲料類などに関連させてもよい。

従来の技術ではイソフラボン類をグルコンからアグルコンの形同時に転換させて、有機溶媒中のアグルコンイソフラボン類を回収するワンポット方法の利用は

、おおくの理由で意図されていなかったであろう。マメ科の植物のグルコシド型の切断後にプロセスから残渣物を除去する必要があると思われていた。また、有機溶媒はアグルコン型を形成するための酵素を不活性化するであろう考えられていた。結果として先行技術では、水溶性グルコン型を水不溶性アグルコン型に、多段階に転換して、続いてアグルコンをを適当な有機溶媒中に抽出することが行われていた。

本発明の具体例を以下の非制限的な実施例を参照して説明する。

〔実施例 1〕

脱脂大豆粉2000kgを、図 1 に示すように、脱イオン水5000Lと β -グルカナーゼ/b-キシラナーゼ(Bio-Feed Beta CT:Novo Nordisk, Denmark)10kgの入った10000Lの容器に入れた。酢酸エチル1000Lを水性懸濁液の表面に層を形成させて2相の組み合わせとした。水相及び溶媒相の両相を垂直プロペラ攪拌機(図 1)を使用してゆるやかに攪拌した。水相と有機溶媒相間の接触点で、アグルコンイソフラボン水相から有機溶媒相に直ぐに移動する。水相を一定に攪拌することは加水分解されたイソフラボン類を酢酸エチルに最大限に曝すことを意図している。酢酸エチルを一定に攪拌することは、両相間の高濃度イソフラボン勾配を確かにするの助けとなり、それによって水不溶アグルコン型を酢酸エチルへの溶解率を最大にする。任意に、両相間をさらに接触させてより濃度の低い水性懸濁液を酢酸エチル相を循環させる。

約4～約48時間後、好ましくは8時間程度で攪拌、再循環プロセスを停止し、両相を最大限に分離させる。酢酸エチルは蒸留機を用いて蒸発させる。約20Lの油が蒸発せずに残った。この油にヘキサン200Lを加えて攪拌機によって約5分激しく攪拌した。これを一夜(約18時間)攪拌することなく静置したアグルコンイソフラボン類を含む粒子が反応器の底に沈殿したのが見られた。ヘキサン：油相をスラッジを残してデカントした。さらに5Lのヘキサンをスラッジに加えて残りの油を除去した。この混合物を1時間静置すると、粒子物質が再び沈殿してきた。ヘキサン：油相をセミースラッジを残してデカントして、セミースラッジを集めてオーブンで約85℃で乾燥した。HPLC分析によってこの物質

が約36～70パーセント（代表的には約60%）のイソフラボンを含むことが分かった重要なことは抽出物中のイソフラボン類の比率が出発材料のイソフラボン類の比率と比較できることであり、イソフラボン収率は典型的には非常に高い（表2。この物質はそのまま使用することができ、またはイソフラボン類をさらに精製するためにさらなる処理に供することができる。

表2

実施例1に記載の抽出法を用いてのイソフラボン類の全大豆からの回収

イソフラボン	出発材料の回収%
ダイゼイン	80.3
ゲニステイン	76.3
グリシテイン	75

〔実施例2〕

出発材料は、大豆胚軸(soy hypocotyls)と大豆子葉(soy cotyledons)との混合物を含有し、イソフラボン類のより豊富な資源（全大豆粉の約0.2%に比べると約10%）である粗びき大豆粕(soy grits)200kgである。この大豆粕200kgを脱イオン水1000Lとグルカンヒドロラーゼ(glucan hydrolase) (Bio-Feed Beta CT:Novo Nordisk, Denmark)2.5kgを含む3000L容器中に置く。酢酸エチル1000Lを加え、水相と溶媒相とを1分間約200Lの能力を持つポンプを用いて激しく互いに混合して二相間を効率的に接触させる、すなわち、エマルジョンを形成させる。この混合を室温で1-24時間続けるが、しかし好ましくは4時間である。この混合物の中の粒子状材料を、その後濾過または遠心分離のような通常的手段で液相から分離する。この粒状材料の除去はエマルジョンを破壊し、得られた液相を約30分間放置することによって、水相と酢酸エチル相との間の分離を効率的にする。この酢酸エチルはイソフラボン類を含有しており、これを取り出し、蒸留に付す。酢酸エチルの蒸留後に残存する残滓油は上記の実施例1に概要を述べた手段によって処理される。イソフラボンに富む材料を分離する。

〔実施例3〕

クローバー(clover)500kgを向流抽出ユニット(counter-current unit)中に導

入し、50%エタノール5000Lと6時間混合する。溶媒抽出物をポンプで吸い取り貯蔵し、クローバーは廃棄する。このエタノールを温度80℃及び圧力(-80kPa)でロータリーエバポレーショ

ンすることによって回収して抽出濃縮物（水中に油を含有しているイソフラボン）500Lを得る。エタノール／水混合物4000Lを回収する。この濃縮物を酢酸エチルと比率1:4(すなわち、酢酸エチル2000L)と混合し、この混合物を水層と酢酸エチル層とに分離させる。イソフラボン類は酢酸エチル層に溶解する。この酢酸エチル層をポンプで蒸留装置中に導入し、水を添加して真空下で溶媒を蒸発させる。湿潤フロック(wet floc)（活性成分）を貯蔵タンクにポンプで移動させる。この湿潤フロックの50%を噴霧乾燥剤と混合し、噴霧乾燥し、活性イソフラボン類を回収する(25%)。残りの50%をヘキサンで洗浄し、脱水し、90℃で乾燥し、粉碎し、錠剤にするために担体／賦形剤と混合する。

〔実施例4〕

上記実施例1～3の乾燥製品（サンプル1）は、グリシテイン(glycitein)と共に／共にではなくゲニステイン(genistein)またはダイゼイン(daidzein)を濃縮するための出発材料として用いられる。精製は、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー及びその他のクロマトグラフィーを用いる分離を含む通常の方法によって行われる。この実施の一例は、実施例1～3の乾燥製品3kgを分画してダイゼイン及びゲニステインを分離する。ダイゼインは、純度95-99%（典型的には純度98.5%）で単離される。ゲニステインは、同様の純度で回収される。

〔実施例5〕

上記実施例に従って、抽出された製品から医薬組成物を調製する。

1. 次の組成物が錠剤の形で調製される：

実施例1に従って調製され、（ゲニステイン35重量%及びダイゼイン28重量%）を含む大豆粉抽出物を用いる。

抽出物 60mg

通常の錠剤のための不活性担体 340mg

この組成物を錠剤としてゲニステイン20mgとダイゼイン17mgとを

含有する400mgの錠剤を調製する。

2. 次の組成物がカプセルの形で調製される。

実施例2によって調製され、(ゲニステイン18重量%、ダイゼイン35重量%及びグリシテイン18重量%)を含有する大豆胚軸抽出物を用いる。

抽出物 60mg

通常の医薬不活性担体 190mg

全ては非毒性のゼラチンカプセルに含有され、ゲニステイン約11mg、ダイゼイン約21mg及びグリシテイン約11mgを含有するカプセルを得る。

3. 次の組成物が錠剤の形で調製される：

実施例4によって調製され、(ゲニステイン99.5重量%)を含有するゲニステイン抽出物を用いる。

抽出物 50mg

通常の錠剤の不活性担体 150mg

この組成物は、錠剤にされ、ゲニステイン50mgを含有する200mgの錠剤を得る。

。

4. 次の組成物が錠剤の形で調製される：

実施例4によって調製されたイソフラボン類40mgと不活性賦形剤／担体460mgとを含有する500mgの錠剤。

上記の担体は、セルロース（マイクロクリスタリン）、リン酸水素カルシウム、大豆ポリサッカライド、ステアリン酸マグネシウム及びコロイド状シリカ（無水物）を含むものである。

本明細書及び後述の請求の範囲を通して、文脈か他のことを要しない限り、

“よりなる”という語、又は単数の“よりなる”または“よりなっている”のようなバリエーションは、述べられている整数又は工程あるいは複数の整数又は工程のグループを含むと解釈され、他の複数の整数又は工程あるいは整数又は工程のグループを排除していると解釈されるべきではないと理解される。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/AU 98/00305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int Cl ⁶ : C07D 311/36 311/40 C12P 17/06 A61K 31/35		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07D 311/36, 311/40, C12P 17/06, A61K 31/35		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DERWENT WPAT: CA (STN) Keywords: DAIDZEIN or DAIDZIN or GENISTEIN or GENISTIN		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Derwent Abstract Accession No. 95-272884/36, Class B02, JP 07173148 A (KIKKOMAN CORP) 11 July 1995 whole document	1, 6, 10, 12-14, 16, 19-20, 22
A	AU 78399/94 A (PROTEIN TECHNOLOGIES) 20 April 1995	1-22
A	AU 78002/94 (680554) B (PROTEIN TECHNOLOGIES) 20 April 1995	1-22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June 1998		Date of mailing of the international search report -2 JUL 1998
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No.: (02) 6285 3929		Authorized officer CEDRIC SCHAFER Telephone No.: (02) 6283 2277

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/AU 98/00305

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
AU	78399/94	BR	9407820	CA	2174120	CN	1135222
		EP	794960	JP	9506076	US	5637562
		WO	9510529				
AU	78002/94	BR	9407822	CA	2173999	CN	1135214
		EP	723536	JP	9506077	US	5637561
		WO	9510512				

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコート (参考)
// C 1 2 N	9/24	C 1 2 N	9/24
	9/42		9/42
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW		
(72)発明者	フアン, ジウ, リ オーストラリア ニューサウスウェールズ 2066, レイン コーブ, パーリ ストリート, 23/9		
(72)発明者	ディーコンーショウ, マーク, ジー. オーストラリア ニューサウスウェールズ 2256, クールウオン, グレンロック パレード 72		
(72)発明者	ウォーリング, マーク, エイ. オーストラリア ニューサウスウェールズ 2010, エラノラ ヘイツ, エラノラ ロード 68		